

FALLON

FOR DU PONT USE ONLY

TRANSLATION

**EUROPEAN PATENT
PUBLICATION NO. 296 506 B1**

International Classification⁵: C12P 7/44, // (C12N1/20, C12R1:74)

Date of Publication of Patent: 21 April 1993. Application No.: 88109721.6.

Date of application: 18 June 1988. Priority: 26 June 1987, DE 3721119.

Date of publication of application: 28 December 1988, Bulletin 88/52.

Date of announcement of grant of patent: 21 April 1993, Bulletin 93/16.

Designated contracting states: AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL.

Proprietor:
Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Düsseldorf

Inventors:
Dr. Joachim Schindler, Dr. Urs Hänggi, Dr. Heinrich Waldhoff

Reservations:

EP-A-0 199 972

CHEMICAL ABSTRACTS: Vol. 95, No. 7, September 1981, page 521, Summary No. 113400k, Columbus, Ohio, US; & JP-A-81 26 191 (NIPPON MINING CO., LTD) 13 March 1981

CHEMICAL ABSTRACTS: Vol. 100, No. 11, March 1984, page 432, Summary No. 84258j, Columbus, Ohio, US; & JP-A-58 165 795 (BIO RESEARCH CENTER CO., LTD) 30 September 1983

CHEMICAL ABSTRACTS: Vol. 105, No. 1, July 1986, page 500, Summary No. 5145x, Columbus, Ohio, US; Z.T. LIU et al. "Thermotolerant yeast producing alpha,omega-dibasic acid from n-alkane", & EUR. CONGR. BIOTECHNOL., 3rd 1984, 2, 71-6.

Title:

PRODUCTION OF DICARBOXYLIC ACIDS BY FERMENTATION

Description

The invention concerns the transformation of alkanes, alkenes, alkanols, fatty acids and/or their esters into alpha-omega dicarboxylic acids of the same C-atom number and the same number of double bonds in the presence of a special microorganism of the genus *Candida tropicalis*. In particular the invention concerns the transformation of C-14 monocarboxylic acids or their esters into tetradecane diacid (dodecane dicarboxylic acid).

Dicarboxylic acids with more than 10 C-atoms are difficult to produce by methods of preparative organic chemistry on an industrial scale. This is especially true for dicarboxylic acids which, besides the two terminal carboxyl groups, also display other functional groups such as double bonds or hydroxyl groups.

Therefore it has been attempted to produce dicarboxylic acids preparatively with the aid of the metabolic functions of various microorganisms out of readily accessible raw materials. Thus in German patent 21 40 133 it is proposed that a yeast of the genera *Candida* and *Pichia* be allowed to act under conditions of fermentation on alkanes, primary alkanols or carboxylic acids. For example, if a special strain of *Candida lipolytica* is used, in this case dicarboxylic acids are formed whose C-chain is not or not significantly degraded compared to the initial material and also otherwise displays no changes such as the introduction of new functional groups. Similar procedures in which other special microorganisms are used are described in US patents 3 975 234 and 4 339 536, in British patent 1 450 026, in German preliminary published applications

21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 and 29 51 177 and in the European patent application EP-A-199 972.

US patent 4 474 882 has unsaturated dicarboxylic acids as its subject. The latter are obtained by using a strain of the species *Candida tropicalis* for converting unsaturated monocarboxylic acids with 14 to 22 C-atoms. The unsaturated dicarboxylic acids conform in number and position of the double bond to the initial materials.

However, the desired dicarboxylic acids are obtained by the procedures mentioned only in very small quantities. Thus in the US patent cited with a fermentation time of 2 days yields of dicarboxylic acid between 0.65 g/l and maximally 1.96 g/l are mentioned. Such yields are too low for a process used industrially.

The purpose of the invention is therefore to develop a microorganism capable of transforming fatty acid esters, fatty acids and/or alkanes, alkenes, alkanols or alkenols with 8 to 24 C-atoms in high yields into dicarboxylic acids and at the same time is especially suitable for the production of C-14 dicarboxylic acids.

The subject of the invention is therefore a strain of *Candida tropicalis* with the file designation DSM 4131 with the ability to transform methyl myristate in a yield of more than 30 g/l/6 days into tetradecane diacid.

Another subject of the invention is a process for the fermentative transformation of fatty acid esters, fatty acids, alkenes and/or alkanols with 8-24 C-atoms in the carboxylic acid part in the presence of nutrients and if desired cosubstrates into alpha-omega dicarboxylic acids with the same C-atom number, not counting the alcohol part of the ester, and the same number of CC-double bonds, characterized by the fact that the

transformation is conducted in the presence of a microorganism strain *Candida tropicalis* DSM 4131.

The strain of *Candida tropicalis* used according to the invention was obtained by mutation and selection from the publicly accessible strain *Candida tropicalis* ATCC 20336.

As initial materials for the process according to the invention one may use unbranched and branched alkanes with 8 to 24 C-atoms which if desired may display 1 to 3 internal conjugated or isolated double bonds. The alkanes may be used as defined chemical compounds or as a mixture. Thus, for example, alkane mixtures may be used such as are obtained from mineral oil. One may also use oligomerization products of ethylene.

According to another version of the invention, monocarboxylic acids may also be used. Here unbranched monocarboxylic acids with terminal carboxyl groups are suitable, i.e. compounds which correspond in the number of C-atoms and the number and position of the double bonds to the alkanols listed below. An important group of monocarboxylic acids is the fatty acids on which the naturally occurring fatty acid triglycerides (fats) are based. Fatty acid mixtures with different compositions may be used, i.e. both distilled, prepurified products as well as naturally occurring mixtures. The expert in this field has products available which display a high or a low degree of unsaturation. Examples of fatty acid mixtures are the fatty acids obtained from coconut oil, palm kernel oil, palm oil, peanut oil, cottonseed oil, soybean oil, sunflower oil, linseed oil, beet oil, animal fats or marine animal fats. Another important raw material

is the fatty acid that can be obtained from ricinus oil. This fatty acid consists to a great extent of 12-hydroxyoctadecenoic acid. Besides this other monocarboxylic acids with a secondary hydroxyl group may be used such as 9- or 10- hydroxystearic acid.

Another group of monocarboxylic acids which may be used as the initial materials in the process according to the invention are the below-listed alcohol-homologous carboxylic acids accessible by oligomerization of ethylene. These for the most part involve saturated carboxylic acids. Besides this monocarboxylic acids with an odd number of C-atoms of varying provenience may also be used.

According to another variant of the process of the invention, esters of the above mentioned monocarboxylic acids may also be used. In this case dicarboxylic acids are formed with the same chain length as the basic monocarboxylic acid. Here esters with alcohols of the functionality 1 to 4 and up to 6 C-atoms in the alcohol radical are suitable. An especially preferred class of esters is the esters of the above mentioned carboxylic acids with C₁ to C₄ alcohols. Among the C₁ to C₄ alcohols here, on the one hand, the primary alcohols with 1 to 4 C-atoms, the secondary alcohols with 3 or 4 C-atoms, diols with 2 to 4 C-atoms, triols with 3 to 4 C-atoms or tetraols with 4 C-atoms are suitable.

According to an especially preferred version of the invention naturally occurring fatty acid triglycerides are used as the initial material. Here the oily or tallow-like solid triglycerides listed above with the fatty acids are suitable. Liquid triglycerides are preferred.

According to another version of the invention, primary alcohols with 8 to 24 C-atoms may be used. The alcohols may also be used as a defined compound or as a mixture. Two groups of primary alcohols are of particular significance. On the one hand, the so called fatty alcohols, i.e. mixtures of saturated and unsaturated alcohols which conform in their chain length distribution and number and position of the double bonds to the fatty acid sections from which they are produced. Fatty alcohols contain even numbered alcohols with 1 to 3 double bonds. Especially important constituents with respect to the process of the invention are fatty alcohols of chain length C₁₄, saturated. Another group of primary alcohols is the alcohols accessible by oligomerization of ethylene (Ziegler alcohols). These involve primary unbranched saturated alcohols also with an even number of carbon atoms. Alcohols with odd number of carbon atoms of varying provenance may also be used.

The fermentation medium used to conduct the process of the invention corresponds to that used for the cultivation of *Candida* species, especially media known and described for microorganisms of the species *Candida tropicalis*. Suitable fermentation media contain the usual trace elements and nitrogen source and an additional carbon source not identical to the substrate being transformed. The term trace elements here refers to the salts of the cations ammonium, potassium, sodium, magnesium, calcium and manganese with the anions phosphate, sulfate, chloride. As the nitrogen source, besides inorganic compounds such as (NH₄)₂SO₄, peptone or yeast extract may also be used.

The fermentation solution also contains as a carbon source a cosubstrate. For example, sodium acetate may be used as a cosubstrate. It is also possible to use ordinary sugars such as glucose, fructose, maltose, trehalose and the like as a cosubstrate. Glucose and glycerine are especially preferred cosubstrates.

With regard to conducting the process it has been found that it may be favorable if the cosubstrate, therefore the carbon source, is not added at the beginning of the fermentation but continually in adequate quantities during the reaction. It is also advantageous to keep the pH above 7, approximately in the range of 7.5-8.5 and to regulate it during the fermentation.

According to another version of the process of the invention it is preferred to add emulsifiers to the initial compounds intended for transformation for better distribution in the fermentation medium. Thus, favorable results are achieved if a total of 0.1 to 3 wt. %, relative to the fermentation medium, of emulsifiers are present. Here physiologically tolerable emulsifiers are suitable and especially physiologically tolerable nonionic emulsifiers. Thus, for example, sugar esters or sorbitan esters, ethoxylated sugar esters, ethoxylated sorbitan esters or alkyl glycosides may be used.

By the process of the invention dicarboxylic acids are obtained which correspond in their chain length and in their content of double bonds to the initial material, i.e. the expert in the field through the choice of the initial material can determine which dicarboxylic acids or dicarboxylic acid mixtures he wishes to produce.

For many applications, the unsaturated dicarboxylic acid mixtures produced during fermentation can be used directly. Thus the mixtures are used, e.g., directly for modification of polymers, especially resins.

Examples

The strain *Candida tropicalis* DSM 4131 was used for the synthesis of dicarboxylic acids as follows: Preculture: in a 500 ml Erlenmeyer flask with 100 ml YN-Bouillon (Difco Co) was inoculated with the mutant DSM 4131 and incubated for 24 h at 30°C on the shaker.

Main culture: the main culture medium was inoculated with 10 vol.% of the 24-hour-old preculture and had the following composition: yeast-nitrogen base (Difco Co) + 3.0 % glucose, 0.3 % Na-acetate, 0.3 % peptone and 0.5 % yeast extract. The culture was incubated at 30°C and after 24-30 hours the transformation phase was initiated by transferring 50 ml of main culture into new Erlenmeyer flasks with 50 ml of transformation medium. The medium had the following composition: Yeast-nitrogen base (Difco Co) in 0.3 m PO₄ buffer (pH 8.0) + 0.2 g MYRJ52 + 5.0 g methyl myristate or other substrates. The pH value of the cultures was checked daily and maintained at pH 7.5. Also daily 0.5 % glucose was metered in as a cosubstrate.

Analysis: After 72, 96, 120 and 144 hours samples were taken, the samples were extracted with aliquot quantities of acetic acid ester and analyzed by thin layer chromatography or the Iatroskan method. The following dicarboxylic acid yields were achieved:

Substrate	Yield
Methyl laurate	13 g/l/144 h (Dodecane diacids)
Methyl myristate	44 g/l/144 h (Tetradecane diacids)
Methyl palmitate	20 g/l/144 h (Hexadecane diacids)

Claims

1. *Candida tropicalis* strain with the file number designation DSM 4131 which has the ability to transform methyl myristate in a yield of more than 30 g/l/6 days into tetradecane diacid.
2. Process for fermentative transformation of fatty acid esters, fatty acids, alkenes, alkenols, alkanes and/or alkanols with 8-24 C-atoms, in the case of fatty acid esters relative only to the carboxylic acid part, in the presence of nutrients and, if desired, cosubstrates into alpha-omega dicarboxylic acids with the same C-atom number and the same number of CC double bonds, in the case of the fatty acid esters relative to the carboxylic acid part of the initial substance, characterized by the fact that the transformation is conducted in the presence of a microorganism strain *Candida tropicalis* DSM 4131.
3. Process as in claim 2 characterized by the fact that fatty acid esters with 1-6 C-atoms in the alcohol part, especially fatty acid methyl esters are used as the initial substrate
4. Process as in one of claims 2 or 3 characterized by the fact that one operates with sugar, especially glucose, as a cosubstrate and that the cosubstrate is added during the fermentation in portions.

5. Process as in one of claims 2 through 4 characterized by the fact that the fermentation is conducted at a pH greater than 7 and that the pH is regulated during the reaction.

Translation:
Language Services Unit
Cytech Languages, Inc.
September 4, 1995



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(19)

(11) Veröffentlichungsnummer: 0 296 506 B1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTSCHRIFT

(45) Veröffentlichungstag der Patentschrift: 21.04.93

(51) Int. Cl. 5: C12P 7/44, // (C12N1/20,
C12R1:74)

(21) Anmeldenummer: 88109721.6

DS-13840

(22) Anmeldetag: 18.06.88

(54) Fermentative Herstellung von Dicarbonsäuren.

(30) Priorität: 26.06.87 DE 3721119

5145x, Columbus, Ohio, US; Z.T. LIU et al.:
"Thermotolerant yeast producing alp-
ha,omega-dibasic acid from n-alkane", &
EUR. CONGR. BIOTECHNOL., 3rd 1984, 2, 71-6

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
28.12.88 Patentblatt 88/52

(73) Patentinhaber: Henkel Kommanditgesellschaft
auf Aktien
Postfach 1100 Henkelstrasse 67
W-4000 Düsseldorf-Holthausen(DE)

(45) Bekanntmachung des Hinweises auf die
Patenterteilung:
21.04.93 Patentblatt 93/16

(72) Erfinder: Schindler, Joachim, Dr.
Am Eichelkamp 158
W-4010 Hilden(DE)
Erfinder: Hänggi, Urs, Dr.
Am Wasserturm 4
W-4000 Düsseldorf(DE)
Erfinder: Waldhoff, Heinrich, Dr.
Am Alten Broich 83 b
W-4018 Langenfeld(DE)

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE ES FR GB IT LI NL

(56) Entgegenhaltungen:
EP-A- 0 199 972

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 95, Nr. 7, Sep-
tember 1981, Seite 521, Zusammenfassung
Nr. 113400k, Columbus, Ohio, US; & JP-A-81
26 191 (NIPPON MINING CO., LTD) 13-03-1981

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 100, Nr. 11,
März 1984, Seite 432, Zusammenfassung Nr.
84258j, Columbus, Ohio, US; & JP-A-58 165
795 (BIO RESEARCH CENTER CO., LTD)
30-09-1983

CHEMICAL ABSTRACTS, Band 105, Nr. 1, Juli
1986, Seite 500, Zusammenfassung Nr.

EP 0 296 506 B1

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingeleitet, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99(1) Europäisches Patentübereinkommen).

Beschreibung

Die Erfindung betrifft die Umwandlung von Alkanen, Alkenen, Alkanolen, Fettsäuren und/oder deren Estern in alpha-omega-Dicarbonsäuren gleicher C-Atomzahl und gleicher Anzahl an Doppelbindungen in Gegenwart eines speziellen Mikroorganismus der Gattung *Candida tropicalis*. Insbesondere betrifft die Erfindung die Umwandlung von C-14-Monocarbonsäuren oder deren Estern in Tetradecanidisäure (Dodecandicarbonsäure).

Dicarbonsäuren mit mehr als 10 C-Atomen sind nach Methoden der präparativen organischen Chemie im technischen Maßstab schwer herstellbar. Dies gilt insbesondere für Dicarbonsäuren, die außer den beiden endständigen Carboxylgruppen noch weitere funktionelle Gruppen wie Doppelbindungen oder Hydroxylgruppen aufweisen.

Man hat daher versucht, aus gut zugänglichen Rohstoffen mit Hilfe der Stoffwechselleistungen verschiedener Mikroorganismen Dicarbonsäuren präparativ zu erzeugen. So wird in der deutschen Patentschrift 21 40 133 vorgeschlagen, auf Alkane, primäre Alkanole oder Carbonsäuren eine Hefe der Gattung *Candida* und *Pichia* unter Fermentationsbedingungen einwirken zu lassen. Bei Einsatz von zum Beispiel einem speziellen Stamm von *Candida lipolytica* entstehen dabei Dicarbonsäuren, deren C-Kette gegenüber dem Ausgangsmaterial nicht oder nicht wesentlich abgebaut ist und auch ansonsten keine Veränderungen wie Einführen neuer funktioneller Gruppen aufweist. Ähnliche Verfahren, bei denen spezielle andere Mikroorganismen eingesetzt werden, sind beschrieben in den US-Patenten 3 975 234 und 4 339 536, in der britischen Patentschrift 1 450 026 sowie in den deutschen Offenlegungsschriften 21 64 626, 28 53 847, 29 37 292 und 29 51 177 und der europäischen Patentanmeldung EP-A-199 972.

Das US-Patent 4 474 882 hat ungesättigte Dicarbonsäuren zum Gegenstand. Diese werden gewonnen, indem ein Stamm der Spezies *Candida tropicalis* zur Umwandlung von ungesättigten Monocarbonsäuren mit 14 bis 22 C-Atomen eingesetzt wird. Die ungesättigten Dicarbonsäuren entsprechen in der Anzahl und Lage der Doppelbindung den Ausgangsmaterialien.

Nach den genannten Verfahren werden jedoch die gewünschten Dicarbonsäuren nur in recht kleinen Mengen erhalten. So sind im genannten US-Patent bei einer Fermentationsdauer von 2 Tagen Ausbeuten an Dicarbonsäure zwischen 0,65 g/l und maximal 1,96 g/l genannt. Für ein technisch genutztes Verfahren sind derartige Ausbeuten zu niedrig.

Aufgabe der Erfindung ist daher, einen Mikroorganismus bereitzustellen, der in der Lage ist, Fettsäureester, Fettsäuren und/oder Alkane, Alkene, Alkanole oder Alkenole mit 8 - 24 C-Atomen in hohen Ausbeuten in Dicarbonsäuren zu überführen und dabei insbesondere zur Herstellung von C-14-Dicarbonsäuren geeignet ist.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein *Candida tropicalis*-Stamm mit der Hinterlegungsbezeichnung DSM 4131 der die Fähigkeit aufweist, Methylmyristat in einer Ausbeute von mehr als 30 g/l / 6 Tage in Tetradecanidisäure umzuwandeln.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur fermentativen Umwandlung von Fettsäureestern, Fettsäuren, Alkenen und/oder Alkanolen mit 8 - 24 C-Atomen im Carbonsäureteil in Gegenwart von Nährstoffen und gewünschtenfalls Cosubstraten in alpha-omega-Dicarbonsäuren mit gleicher C-Atom-Zahl, ohne Berücksichtigung des Alkoholteils der Ester, und gleicher Anzahl an CC-Doppelbindungen, dadurch gekennzeichnet, daß die Umwandlung in Gegenwart eines Mikroorganismenstammes *Candida tropicalis* DSM 4131 durchgeführt wird.

Der erfindungsgemäß eingesetzte Stamm *Candida tropicalis* wurde durch Mutation und Selektion aus dem öffentlich zugänglichen Stamm *Candida tropicalis* ATCC 20336 gewonnen.

Als Ausgangsmaterialien können für das erfindungsgemäße Verfahren unverzweigte und verzweigte Alkane mit 8 bis 24 C-Atomen, die gewünschtenfalls 1 bis 3 innenständige konjugierte oder isolierte Doppelbindungen aufweisen, eingesetzt werden. Die Alkane können als definierte chemische Verbindungen oder als Mischung eingesetzt werden. So können beispielsweise Alkangemische eingesetzt werden wie sie aus Mineralöl erhalten werden. Weiterhin eingesetzt werden können auch Oligomerisierungsprodukte des Ethylen.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können auch Monocarbonsäuren eingesetzt werden. Hier sind unverzweigte Monocarbonsäuren mit endständiger Carboxylgruppe geeignet, das heißt Verbindungen, die in der Anzahl der C-Atome und Zahl und Lage der Doppelbindungen den unten aufgeführten Alkoholen entsprechen. Eine wichtige Gruppe von Monocarbonsäuren sind Fettsäuren, wie sie den natürlich vorkommenden Fettsäuretriglyceriden (Fette) zu Grunde liegen. Eingesetzt werden können Fettsäuregemische mit unterschiedlicher Zusammensetzung, das heißt sowohl destillierte, vorgereinigte Produkte wie auch die natürlich vorkommenden Mischungen. Auf diesem Gebiet stehen dem Fachmann Produkte zur Verfügung, die einen hohen oder einen niederen Grad an Unsatigung aufweisen. Beispiel für

Fettsäuregemische sind die Fettsäuren, die aus Cocosöl, Palmkernöl, Palmöl, Erdnußöl, Baumwollsaatöl, Sojabohnenöl, Sonnenblumenöl, Leinöl, Rüböl, tierischen Fetten oder seetierischen Fetten herstellbar sind. Ein weiterer wichtiger Rohstoff ist die Fettsäure, die aus Ricinusöl gewonnen werden kann. Diese Fettsäure besteht zum großen Teil aus 12-Hydroxyoctadecensäure. Darüber hinaus können weitere Monocarbonsäuren mit einer sekundären Hydroxylgruppe eingesetzt werden, beispielsweise die 9- oder 10-Hydroxystearinsäure.

Eine weitere Gruppe von Monocarbonsäuren, die im erfindungsgemäßen Verfahren als Ausgangsstoffe eingesetzt werden können, sind die zu den unten aufgeführten durch Oligomerisierung von Ethylen zugänglichen Alkoholen homologen Carbonsäuren. Dabei handelt es sich größtenteils um gesättigte 10 Carbonsäuren. Darüber hinaus können auch Monocarbonsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen verschiedener Provenienz eingesetzt werden.

Nach einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens können auch Ester der vorgenannten 15 Monocarbonsäuren eingesetzt werden. Dabei entstehen Dicarbonsäuren mit der gleichen Kettenlänge wie die zugrundeliegende Monocarbonsäure. Geeignet sind hier Ester mit Alkoholen der Funktionalität 1 bis 4 und bis zu 6 C-Atomen im Alkoholrest. Eine besonders bevorzugte Klasse von Estern sind die Ester der 20 genannten Carbonsäure mit C₁ bis C₄-Alkoholen. Unter C₁ bis C₄-Alkoholen sind hier zum einen die primären Alkohole mit 1 bis 4 C-Atomen, die sekundären Alkohole mit 3 oder 4 C-Atomen, Diole mit 2 bis 4 C-Atomen, Triole mit 3 bis 4 C-Atomen oder Tetraole mit 4 C-Atomen geeignet.

Nach einer besonders bevorzugten Ausführungsform der Erfindung werden natürlich vorkommende 25 Fettsäuretriglyceride als Ausgangsmaterial eingesetzt. Hier eignen sich die vorstehend bei den Fettsäuren diskutierten ölichen oder talgartig festen Triglyceride. Bevorzugt sind flüssige Triglyceride.

Nach einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können primäre Alkohole mit 8 bis 24 C-Atomen 30 eingesetzt werden. Auch die Alkohole können als definierte Verbindung oder als Mischung eingesetzt werden. Zwei Gruppen von primären Alkoholen sind von besonderer Bedeutung. Zum einen die sogenannten Fettalkohole, das sind Mischungen von gesättigten und ungesättigten Alkoholen, die in ihrer Kettenlängenverteilung und Anzahl und Lage der Doppelbindungen den Fettsäureschnitten entsprechen, aus denen sie hergestellt worden sind. Fettalkohole enthalten geradzahlige Alkohole mit 1 bis 3 Doppelbindungen. Besonders wichtige Bestandteile sind im Hinblick auf das erfindungsgemäße Verfahren Fettalkohole der 35 Kettenlänge C₁₄, gesättigt. Eine weitere Gruppe von primären Alkoholen sind die durch Oligomerisierung von Ethylen zugänglichen Alkohole (Ziegler-Alkohole). Dabei handelt es sich um primäre, unverzweigte, gesättigte Alkohole mit ebenfalls einer geraden Anzahl von Kohlenstoffatomen. Auch Alkohole mit ungerader Anzahl von C-Atomen verschiedener Provenienz können eingesetzt werden.

Das zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens eingesetzte Fermentationsmedium entspricht 40 den für die Anzucht von Candida-Arten, insbesondere von Mikroorganismen der Spezies Candida tropicalis bekannten und beschriebenen Medien. Geeignete Fermentationsmedien enthalten die üblichen Spurenelemente, eine Stickstoffquelle und eine zusätzliche, dem zu transformierenden Substrat nicht identische Kohlenstoffquelle. Unter Spurenelementen sind hier Salze der Kationen Ammonium, Kalium, Natrium, Magnesium, Calcium und Mangan mit den Anionen Phosphat, Sulfat, Chlorid zu verstehen. Als Stickstoffquelle können neben anorganischen Verbindungen wie zum Beispiel (NH₄)₂SO₄ auch Pepton oder Hefeextrakt eingesetzt werden.

Die Fermentationslösung enthält weiterhin als Kohlenstoffquelle ein Cosubstrat. Als Cosubstrat kann 45 beispielsweise Natriumacetat eingesetzt werden. Weiterhin ist es möglich, daß als Cosubstrat übliche Zucker wie Glucose, Fructose, Maltose, Trehalose und dergleichen eingesetzt werden. Besonders bevorzugte Cosubstrate sind Glucose und Glycerin.

Im Hinblick auf die Verfahrensführung hat sich gezeigt, daß es günstig sein kann, wenn das Cosubstrat, also die Kohlenstoffquelle, nicht am Anfang der Fermentation sondern kontinuierlich in ausreichenden Mengen während der Umsetzung zugegeben werden. Vorteilhaft ist es auch, den pH-Wert über 7 zu halten, etwa im Bereich 7,5 - 8,5, und während der Fermentation nachzuregeln.

Nach einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist es bevorzugt, den zur 50 Umwandlung vorgesehenen Ausgangsverbindungen zur besseren Verteilung im Fermentationsmedium Emulgatoren zuzufügen. So werden günstige Ergebnisse erzielt, wenn insgesamt 0,1 bis 3 Gew.-%, bezogen auf Fermentationsmedium, an Emulgatoren vorhanden sind. Geeignet sind hier physiologisch verträgliche Emulgatoren und insbesonders physiologisch verträgliche nichtionische Emulgatoren. So können beispielsweise Zuckerester oder auch Sorbitanester, ethoxylierte Zuckerester, ethoxylierte Sorbitanester oder auch Alkylglycoside eingesetzt werden.

Nach dem erfindungsgemäßen Verfahren werden Dicarbonsäuren erhalten, die in ihrer Kettenlänge und 55 in ihrem Gehalt an Doppelbindungen dem Ausgangsmaterial entsprechen, d.h. der Fachmann hat es durch Wahl des Ausgangsmaterials in der Hand, welche Dicarbonsäuren oder Dicarbonsäuremischungen er

herstellen will.

Für viele Anwendungen sind die bei der Fermentation hergestellten ungesättigten Dicarbonsäuregemische direkt einsetzbar. So können die Gemische beispielsweise direkt zur Modifizierung von Polymeren, insbesondere Harzen eingesetzt werden.

5

Beispiele

Der Stamm *Candida tropicalis* DSM 4131 wurde wie folgt zur Synthese von Dicarbonsäuren eingesetzt:
Vorkultur: Ein 500 ml Erlenmeyerkolben mit 100 ml YN-Bouillon (Fa. Difco) wurde mit der Mutante DSM

10 4131 beimpft und 24 Std. bei 30 °C auf der Schüttelmaschine inkubiert.

Hauptkultur: Das Hauptkultur-Medium wurde mit 10 Vol% der 24 Stunden alten Vorkultur beimpft und hatte folgende Zusammensetzung: Yeast-Nitrogen-Base (Fa. Difco) + 3.0 % Glucose, 0.3 % Na-Aacetat, 0.3 % Pepton und 0.5 % Hefeextrakt. Die Kultur wurde bei 30 °C inkubiert und nach 24 - 30 Stunden die Transformationsphase eingeleitet, indem 50 ml Hauptkultur in neue Erlenmeyerkolben mit 50 ml Transformationsmedium übertragen wurde. Das Medium hatte folgende Zusammensetzung: Yeast-Nitrogen-Base (Fa. Difco) in 0.3 m PO₄-Puffer (pH 8.0) + 0.2 g MYRJ52 + 5.0g Methylmyristat oder andere Substrate. Der pH-Wert der Kulturen wurde täglich kontrolliert und auf pH 7.5 nachjustiert. Ebenso wurden täglich 0.5 % Glucose als Cosubstrat zudosiert.

Analytik: Nach 72, 96, 120 und 144 Stunden wurden Proben gezogen, die Proben mit aliquoten Mengen 20 Acetessigester extrahiert und per Dünnschichtchromatographie oder latroscan-Methode analysiert. Folgende Dicarbonsäure-Ausbeuten wurden erreicht:

Substrat:

Ausbeute:

25

Methyllaurat

13g/l/144 Std. (Dodecandisäuren)

Methylmyristat

44g/l/144 Std. (Tetradecandisäuren)

30

Methylpalmitat

20g/l/144 Std. (Hexadecandisäuren)

Patentansprüche

35 1. *Candida tropicalis*-Stamm mit der Hinterlegungsbezeichnung DSM 4131 der die Fähigkeit aufweist, Methylmyristat in einer Ausbeute von mehr als 30 g/1 / 6 Tage in Tetradecandisäure umzuwandeln.

40 2. Verfahren zur fermentiven Umwandlung von Fettsäureestern, Fettsäuren, Alkenen, Alkenolen, Alkanen und/oder Alkanolen mit 8 - 24 C-Atomen, im Falle der Fettsäureester nur bezogen auf den Carbonsäureteil, in Gegenwart von Nährstoffen und gewünschtenfalls Cosubstraten in alpha-omega-Dicarbonsäuren mit gleicher C-Atom-Zahl und gleicher Anzahl an CC-Doppelbindungen, im Falle der Fettsäureester bezogen auf den Carbonsäureteil der Ausgangssubstanz, dadurch gekennzeichnet, daß die Umwandlung in Gegenwart eines Mikroorganismenstamms *Candida tropicalis* DSM 4131 durchgeführt wird.

45

3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß man als Ausgangssubstrat Fettsäureester mit 1 - 6 C-Atomen im Alkohol-Anteil, insbesondere Fettsäuremethylester einsetzt.

50

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß man mit Zucker, insbesondere Glucose als Cosubstrat arbeitet, und daß das Cosubstrat während der Fermentation portionsweise zugesetzt wird.

55

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 2 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Fermentation bei einem pH-Wert größer 7 durchgeführt wird, und daß der pH-Wert während der Reaktionsdauer nachgeregt wird.

Claims

1. A *Candida tropicalis* strain deposited under the code name DSM 4131 which has the ability to transform methyl myristate into tetradecanedioic acid in a yield of more than 30 g/16 days.
- 5 2. A process for the fermentative transformation of fatty acid esters, fatty acids, alkenes, alkanols, alkanes and/or alkanols containing 8 to 24 carbon atoms, based solely on the carboxylic acid component in the case of the fatty acid esters, in the presence of nutrients and, if desired, cosubstrates into α,ω -dicarboxylic acids containing the same number of carbon atoms and the same number of carbon-carbon double bonds, based on the carboxylic part of the starting substance in the case of the fatty acid esters, characterized in that the transformation is conducted in the presence of a microorganism strain *Candida tropicalis* DSM 4131.
- 10 3. A process as claimed in claim 2, characterized in that fatty acid esters containing 1 to 6 carbon atoms in the alcohol component, particularly fatty acid methyl ester, are used as the starting substrate.
- 15 4. A process as claimed in claim 2 or 3, characterized in that sugars, particularly glucose, are used as the cosubstrate and in that the co-substrate is added in portions during the fermentation process.
- 20 5. A process as claimed in any of claims 2 to 4, characterized in that the fermentation is carried out at a pH value above 7 and in that the pH value is readjusted during the reaction.

Revendications

- 25 1. Souche de *Candida tropicalis* portant la dénomination de dépôt DSM 4131, qui présente la faculté de transformer le myristate méthylique en acide tétradécanedioïque, avec un rendement supérieur à 30 g/16 jours.
2. Procédé de transformation par fermentation d'esters d'acides gras, d'acides gras, d'alcènes, alcénols, alcanes et/ou alkanols comportant 8 à 24 atomes de C - dans le cas des esters d'acides gras, seulement en ce qui concerne la fraction d'acide carboxylique - en présence de substances nutritives et, le cas échéant, de co-substrats, en acides dicarboxyliques alpha-oméga possédant un nombre identique d'atomes de C et de doubles liaisons CC - dans le cas des esters d'acides gras, en ce qui concerne la fraction d'acide carboxylique de la substance de départ - caractérisé en ce que la transformation se déroule en présence d'une souche de micro-organisme *Candida tropicalis* DSM 4131.
- 35 3. Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'on met en oeuvre comme substance de départ, des esters d'acides gras dont la fraction alcool comporte 1 à 6 atomes de C , en particulier des esters méthyliques d'acides gras.
4. Procédé selon l'une des revendications 2 ou 3, caractérisé en ce que l'on utilise du sucre, en particulier du glucose, comme co-substrat et en ce que ledit co-substrat est additionné par portions au cours de la fermentation.
- 45 5. Procédé selon l'une des revendications 2 à 4, caractérisé en ce que la fermentation se déroule à un pH supérieur à 7 et en ce que le pH est réajusté au cours de la réaction.

50

55